

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 496 689

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 27143

(54)

Procédé et substrat de fermentation à base de protéines de pomme de terre.

(51)

Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 N 1/00 // 9/28; 9/56; C 12 P 21/04.

(22)

Date de dépôt..... 19 décembre 1980.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée :

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 25 du 25-6-1982.

(71)

Déposant : Société anonyme dite : ROQUETTE FRERES, résidant en France.

(72)

Invention de : Michel Huchette et Francis Devos.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Cabinet Plasseraud,
84, rue d'Amsterdam, 75009 Paris.

Procédé et substrat de fermentation.

L'invention a pour objet un procédé de fermentation mettant en oeuvre un substrat de fermentation qui constitue un produit industriel nouveau.

Par l'expression "procédé de fermentation", on désigne tout procédé destiné à la production, par fermentation, de substances telles que les enzymes, des acides organiques, des antibiotiques, des polysaccharides, des acides aminés ou des vitamines.

Dans la mise en oeuvre de ces procédés, on a recours à des milieux de fermentation au sein desquels on introduit des substances nutritives indispensables appartenant au groupe des matières glucidiques, des sels minéraux, des oligo-éléments, des vitamines et des matières protéiques apportant des acides aminés, des polypeptides et des protéines.

Les matières protéiques utilisées jusqu'à ce jour sont généralement constituées par des tourteaux de soja, des levures et des extraits de levure, des eaux de trempage du maïs ou "corn-steep", des farines de sang, des protéines de lait, des "pharmamédia", donnant généralement satisfaction.

L'invention a toutefois pour but de fournir un procédé et un substrat du genre en question conduisant à des résultats améliorés notamment du point de vue du rendement des fermentations et permettant de valoriser, par une grande valeur ajoutée, une matière première dont les applications connues ne mettent pas à profit tous les avantages.

Or, la Société Demanderesse a eu le mérite de trouver que la protéine de pomme de terre obtenue par coagulation des eaux de végétation ou "eaux rouges" -- sous-produit bien connu des féculeries survenant lors de l'extraction de la fécule et de la pulpe des tubercules de pomme de terre -- utilisée en tant que substance nutritive protéique, permettait d'augmenter considérablement le rendement de certaines fermentations et procurait un certain nombre d'autres avantages dont il va être question plus

loin.

Le mérite de la Société Demanderesse est d'autant plus grand que tout portait à croire que la mise en oeuvre de la protéine de pomme de terre en question serait inopérante notamment du fait que ladite protéine se présente sous une forme complètement insolubilisée et dénaturée et bien qu'il était déjà connu d'utiliser directement, comme source de protéines dans les fermentations, des eaux rouges plus ou moins concentrées ou même partiellement déprotéinisées ainsi que d'ailleurs des poudres contenant, sous forme soluble, les mêmes protéines, ces poudres ayant par exemple été obtenues par atomisation à partir d'eaux rouges concentrées.

Le procédé de fermentation conforme à l'invention est donc caractérisé par le fait que l'on a recours, en tant que substance nutritive protéique introduite dans le milieu de fermentation, à une quantité efficace de protéine de pomme de terre obtenue par coagulation des eaux rouges.

Le substrat de fermentation conforme à l'invention est caractérisé par le fait qu'il contient, en tant que substance protéique, une quantité efficace de protéine de pomme de terre obtenue par coagulation des eaux rouges.

Enfin, l'invention vise, en tant qu'application nouvelle de la protéine de pomme de terre obtenue par coagulation des eaux rouges, l'utilisation de celle-ci dans la constitution du substrat de fermentation.

L'invention présente encore un certain nombre d'autres caractéristiques qui s'utilisent de préférence en même temps et dont il sera plus explicitement question ci-après.

Elle pourra être bien comprise à l'aide du complément de description qui suit ainsi que des exemples, l'un et les autres étant donnés surtout en rapport avec des modes de réalisation avantageux.

Se proposant donc de réaliser des fermentations, on s'y prend comme suit ou de façon équivalente, mais en ayant recours, en tant que matière protéique indispensable au bon déroulement de la fermentation, à une quantité effi-

cace de protéine de pomme de terre obtenue par coagulation des eaux rouges.

La coagulation de la protéine à partir des eaux rouges peut être réalisée par voie thermique, chimique ou thermochimique.

Cette protéine contient plus de 70 % de protéine comptée en N x 6,25 sur matières sèches et, plus généralement, de 72 à 95 % de protéines.

Par coagulation thermochimique, on obtient un produit donnant satisfaction et se présentant, après séchage et broyage, sous la forme d'une poudre fine, de couleur grise à verdâtre, dont une composition type est la suivante :

	- Eau	8 à 9 %
15	- Protéines (N x 6,25)	75 à 82 %
	- Résidu à la calcination	1 à 3 %
	- Extrait aqueux	3 à 7 %
	- Extrait à l'éther sulfurique	4 à 6 %

l'extrait à l'éther sulfurique étant constitué pour la plus grande partie par des acides gras. La proportion de certains de ces acides gras peut être la suivante :

	- Acide laurique	1 %
	- Acide myristique	1 %
	- Acide palmitique	27 %
25	- Acide stéarique	7 %
	- Acide oléique	traces
	- Acide linoléique	60 %.

La répartition des différents acides aminés constitutifs de cette protéine, peut s'établir comme suit :

30	<u>Acide</u>	<u>% en poids de l'azote aminé</u>
	- Acide aspartique	12,6
	- Acide glutamique	10,2
	- Alanine	4,6
35	- Arginine	4,8
	- Cystine	1,5
	- Glycine	4,8
	- Histidine	1,8

	<u>Acide</u>	<u>% en poids de l'azote aminé</u>
	- Isoleucine	5,9
	- Leucine	10,0
5	- Lysine	7,5
	- Méthionine	2,1
	- Phénylalanine	6,2
	- Proline	4,8
	- Sérine	5,3
10	- Thréonine	5,7
	- Tyrosine	5,2
	- Valine	7,0.

Pour obtenir la susdite protéine, on peut procéder comme suit.

- 15 On amène les eaux rouges à un pH de l'ordre de 4,6 à 5,2 par addition d'un acide minéral ou organique, puis on les porte à une température suffisante, généralement comprise entre 90 et 110°C, pour provoquer la floculation des protéines. Cette température est maintenue pendant
- 20 une durée suffisante pour parfaire la floculation, c'est-à-dire pour désaérer le floculat et le débarrasser du liquide dans lequel il se trouve en suspension ; en général, cette température est maintenue pendant environ 5 à 15 minutes. Le floculat obtenu est alors séparé par exemple sur une
- 25 décanteuse centrifuge, puis séché sur un séchoir pneumatique.

Cette protéine représente seulement 25 à 30 % environ de la matière sèche contenue dans les "eaux rouges" et ne contient qu'une faible quantité des constituants biologiques essentiels initialement présents dans les eaux

30 rouges, d'où un préjugé défavorable supplémentaire à l'encontre de l'utilisation de cette protéine dans les procédés de fermentation.

Pour mémoire, on rappelle que les eaux rouges

35 surviennent lorsque, pour retirer de la pomme de terre la fécule et la pulpe, on désintègre, dans les féculeries, le tubercule de manière telle que ses cellules constitutives soient broyées, et que l'on sépare ensuite de la bouillie

ou râpure ainsi obtenue la fécule et la pulpe. Les eaux de végétation résiduelles ou "eaux rouges" ainsi obtenues contiennent en solution la plus grande partie des constituants autres que la fécule et la pulpe et comportent donc, à côté
5 des protéines présentes en quantité prépondérante, de très nombreux composés de très haute valeur biologique tels que vitamines, matières minérales, acides organiques, sucres et matières grasses.

La protéine de pomme de terre, outre qu'elle permet d'accroître de façon notable le rendement de certaines fermentations, entraîne pour ces dernières les avantages importants suivants :

- stérilisation du milieu de fermentation beaucoup plus facile,
- 15 - viscosité du milieu de fermentation plus faible, d'où plus grande facilité d'agitation et d'aération,
- purification facilitée des moûts de culture,
- réduction de la pollution,

qui vont être davantage détaillés ci-après.

20 Ainsi, par exemple, des rendements supérieurs de 50 % peuvent être obtenus pour la production d' α -amylase, par remplacement de la protéine de soja classiquement utilisée par la protéine de pomme de terre coagulée.

La richesse en protéine vraie de la protéine
25 utilisée selon l'invention étant approximativement le double de celle des tourteaux de soja, le même taux d'azote peut être obtenu par une mise en oeuvre deux fois moins élevée. Il s'ensuit une viscosité beaucoup plus faible du milieu ainsi qu'une plus grande facilité d'aération et
30 d'agitation.

La purification des moûts de culture est d'autre part plus facile étant donné l'absence de matières inertes comme, par exemple, les matières cellulosiques, d'où une diminution de la perte en produits nobles dans les gâteaux
35 de filtration ou dans les boues de centrifugation.

La protéine de pomme de terre ayant, après broyage, une granulométrie très fine, inférieure à 200 μ et plus généralement inférieure à 50 μ , elle se disperse très faci-

lement dans l'eau, ce qui a pour effet de faciliter la stérilisation du milieu.

Etant donné son procédé d'obtention par coagulation thermique puis séchage dans un équipement agro-alimentaire, le produit a d'autre part un niveau de contamination bactériologique très faible, ce qui présente un grand intérêt dans les processus fermentaires.

Les rendements de fermentation élevés obtenus grâce à l'utilisation de la protéine de pomme de terre entraînent enfin une meilleure productivité du matériel et permettent des réductions importantes de la pollution par unité biologique produite.

La mise en oeuvre de cette protéine de pomme de terre dans le procédé de fermentation conforme à l'invention ou dans la constitution des substrats de fermentation, est réalisée par introduction de la protéine dans le milieu de fermentation sous agitation, toutes les autres caractéristiques du procédé étant équivalentes à celles des procédés déjà connus.

Les exemples suivants se rapportent à des modes de réalisation avantageux.

EXEMPLE 1

Production d' α -amylase bactérienne.

Deux fermenteurs B_1 et B_2 de type BIOLAFITTE de 20 litres ont été garnis de milieux de fermentation contenant :

	B_1	B_2
Malto-dextrine	750 g	750 g
$NH_4 NO_3$	60 g	60 g
Protéine de pomme de terre	590 g	0 g
Tourteaux de soja	0 g	1050 g

La protéine de pomme de terre floculée par thermo-coagulation mise en oeuvre se présentait sous la forme d'une poudre très fine, 99 % en poids des particules ayant une dimension inférieure à 50 μ ; elle présentait une perte à la dessiccation de 6,2 % et titrait, 84,9 % de protéines sur matière sèche (N x 6,25).

Le résidu à la calcination de cette protéine était

égal à 2,7 %, le pourcentage de lipides totaux était de 3,5 % et l'extrait aqueux était égal à 6,0 %, ces trois derniers pourcentages étant exprimés sur la matière commerciale telle quelle.

5 Les tourteaux de soja utilisés dans le présent exemple titraient environ 48 % de protéines (N x 6,25).

Les contenus des deux fermenteurs ont été ajustés à 15 litres ; ils ont été ensemencés chacun à l'aide de 300 ml d'une préculture de 48 heures de *Bacillus Subtilis* 10 cultivé sur un milieu contenant 2 % d'extraits de levure et 5 % de malto-dextrine.

Les conditions de la fermentation à l'intérieur des fermenteurs B₁ et B₂ étaient les suivantes :

15 Aération : 1 volume d'air à la minute,
soit 22 l/minute
Agitation : 700 tours/minute
Température : 35°C.

La production d' α -amylase a été suivie sur chacun des fermenteurs en mesurant l'activité par la méthode UBR 20 (Unité Bactérienne RAPIDASE). Selon cette méthode, l'activité dextrinifiante des amylases bactériennes est évaluée en mesurant le temps nécessaire à l'apparition d'un changement de couleur à l'iode du substrat, ce changement correspondant à la dextrinification de celui-ci. L'unité UBR est 25 définie comme étant la quantité d'enzyme qui dextrinifie 1 mg d'amidon en 1 minute.

Le tableau I ci-dessous présente les résultats obtenus.

TABLEAU I

30	Temps de fermentation	Activité dans B 1 (en UBR)	Activité dans B 2 (en UBR)
	19 h	400	190
	26 h	620	300
	43 h	785	550
35	67 h	1300	700

Cette expérimentation a été reproduite cinq fois de suite. Les activités obtenues après un temps de 67 heures, au cours de ces cinq expérimentations, sont indiquées dans le tableau II.

5

TABLEAU II

Essai	Activité dans B 1 (en UBR)	Activité dans B 2 (en UBR)
1	1 300	700
2	1 150	750
10 3	1 220	800
4	1 380	730
5	1 210	770

Des résultats numériques réunis dans le tableau II découle une moyenne de 1250 UBR par utilisation de la protéine de pomme de terre et de 750 UBR sur soja ; on enregistre donc une augmentation d'activité de 500 UBR, soit environ 66,7 %, par rapport à l'activité obtenue sur soja.

Outre cette amélioration très sensible de l'activité, l'utilisation de la protéine de pomme de terre présente plusieurs autres avantages importants par rapport à l'utilisation de tourteaux de soja.

La viscosité du milieu de fermentation est moins forte dans le fermenteur B 1, ce qui facilite l'aération.

La floculation des corps bactériens ainsi que la filtration sont facilitées sur le milieu à base de protéine de pomme de terre. Ainsi, après chauffage à 50°C, les deux milieux ont été filtrés, après ajustement à 15 litres, sur filtre Buchner de laboratoire. La vitesse de filtration, ramenée à 1 m² de surface de filtration, est égale à environ 250 litres par m² et par heure pour le milieu à base de protéine de pomme de terre, alors qu'elle n'est que de 180 litres par m² et par heure pour le milieu à base de soja.

Le poids du gâteau humide était, d'autre part, trois fois plus important dans le cas du milieu à base de soja que dans le cas du milieu à base de protéine de pomme

de terre. Le volume de filtrat récupéré était, quant à lui, de 14 litres pour le premier milieu et de 12 litres pour le second milieu.

EXEMPLE 2

5 Production d' α -amylase thermo-résistante.

Dans le but de produire une α -amylase thermo-résistante, une souche de *Bacillus Licheniformis* ATCC 6598 a été cultivée dans trois milieux différents contenus dans trois fermenteurs distincts et contenant du sirop de maltose comme source de carbone ainsi que :

- de la farine de soja, ou
- de la protéine de pomme de terre thermocoagulée, ou
- des solubles de maïs et de la protéine de pomme de terre,

15 comme source d'azote.

La culture du microorganisme a été effectuée dans tous les cas à 43°C et l'activité de l' α -amylase produite a été déterminée selon la méthode SKB, telle que décrite dans "Cereal Chemistry", 16, 172 (1939).

20 Premier fermenteur

La souche de *Bacillus Licheniformis* a été cultivée dans des erlenmeyers de 2 litres, placés sur secoueuse rotative fonctionnant à 220 tours/minute, ces erlenmeyers contenant 400 ml d'un milieu ayant la composition suivante:

- | | | |
|----|-----------------------------------------------------------|-----------|
| 25 | - Sirop de maltose | 100 g/l |
| | - Farine de soja | 30 g/l |
| | - Na_2HPO_4 12 H_2O | 5 g/l |
| | - KH_2PO_4 | 1 g/l |
| | - Huile de lard | 0,5 ml/l. |

30 Après 30 heures de préculture, les 400 ml ont été introduits dans un fermenteur de production de 20 litres, contenant un milieu de composition analogue à celui de préculture.

Les conditions de culture ont été les suivantes :

- | | | | |
|----|---------------|---|-------------------|
| 35 | - Agitation | : | 1200 tours/minute |
| | - Aération | : | 0,8 volume/minute |
| | - Température | : | 43°C |
| | - Temps | : | 120 heures |

10

- pH de départ égal à 6,7, puis stabilisation à pH 7.

L'activité finale mesurée a été de :

4 140 SKB à 37°C

5 15 525 SKB à 85°C.

Deuxième fermenteur

Le même processus que précédemment a été appliqué, hormis le fait que les milieux de préculture et de production avaient la composition suivante :

- | | | |
|----|--------------------------------------------------------------------|---------|
| 10 | - Sirop de maltose | 110 g/l |
| | - Protéine de pomme de terre
(identique à celle de l'exemple 1) | 15 g/l |
| | - Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O | 5 g/l |
| | - KH ₂ PO ₄ | 1 g/l |
| 15 | - Huile de lard | 5 ml/l. |

Les conditions de culture étaient identiques à celles choisies pour le premier fermenteur.

L'activité finale mesurée a été de :

5 000 SKB à 37°C

20 18 735 SKB à 85°C,

soit une augmentation d'activité d'environ 20 %, obtenue par simple remplacement de la farine de soja par la protéine de pomme de terre.

Troisième fermenteur

25 Le processus opératoire ainsi que les conditions de culture ont été les mêmes que pour les deux fermenteurs précédents.

Le milieu de culture avait ici la composition suivante :

- | | | |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 30 | - Sirop de maltose | 110 g/l |
| | - Protéine de pomme de terre
(identique à celle de l'exemple 1) | 15 g/l |
| | - Eaux de trempage du maïs
(Corn steep liquide à 50 % de
matière sèche) | 5 g/l |
| 35 | - Na ₂ HPO ₄ | 5 g/l |
| | - Huile de lard | 5 ml/l. |

L'activité finale mesurée a été de :

5 000 SKB à 37°C

19 000 SKB à 85°C,

soit une activité à peu près équivalente à celle obtenue dans le second fermenteur.

EXEMPLE 3

Production d'une protéase bactérienne neutre de

5 Bacillus Subtilis.

Cet exemple établit une comparaison entre les rendements obtenus dans la production d'une protéase bactérienne neutre de *Bacillus Subtilis*, d'une part, sur un milieu contenant de la protéine de pomme de terre et, d'autre part, sur un milieu contenant un isolat de soja.

Deux fermenteurs de 20 litres, contenant environ 15 litres de milieu identifié ci-après, ont ainsi été préparés ; les compositions des deux milieux de production étaient les suivantes :

15		Fermenteur N° 1	Fermenteur N° 2
	Malto-dextrine de DE = 17	3 750 g	3 750 g
	H ₃ PO ₄	62,5 ml	62,5 ml
	Protéine de soja (N x 6,25 = 92 %)	525 g	-
20	Levure sèche (N x 6,25 = 45 %)	37,5 g	37,5 g
	Corn steep liquide (à 50 % de matières sèches)	125 g	100 g
	Protéine de pomme de terre thermo- coagulée (79,2 % N x 6,25)	-	615 g
25	(NH ₄) ₂ HPO ₄	125 g	125 g
	MgSO ₄ 7 H ₂ O	12,5 g	12,5 g
	Zn SO ₄	0,5 g	0,5 g.

Deux précultures de 50 ml, soit environ 0,33 % d'ensemencement, établies sur des milieux de préculture de compositions respectivement identiques à celles des milieux de production, ont servi à ensemer les deux fermenteurs.

Pour la préparation de ces inoculums et pour la réalisation du processus de production, les mêmes paramètres de culture ont été utilisés, à savoir :

- pH : 6,9 à 7,2
- Température : 37°C
- Aération : 1 l d'air/l de milieu/minute
- 40 - Agitation : 180 t/minute.

Des échantillons ont été prélevés sur les deux fermenteurs à partir de la 16ème heure afin de vérifier l'activité enzymatique, ceci jusqu'à obtention d'une activité constante pendant deux à trois heures.

- 5 La méthode de dosage de l'activité enzymatique repose sur le principe suivant lequel l'enzyme agissant sur la caséine libère des produits d'hydrolyse non précipitables par l'acide trichloroacétique, ce qui donne avec le réactif de FOLIN une coloration bleue, que l'on mesure au
10 spectrophotomètre à 660 mμ. Cette méthode constitue une modification de la méthode dite d'ANSON (J. Gen. Physiol. 22, 79 (1938)), la caséine étant utilisée comme substrat à la place de l'hémoglobine.

Les résultats obtenus sur les deux fermenteurs
15 ont été les suivants :

	<u>Fermenteur N° 1</u>	<u>Fermenteur N° 2</u>
- durée de fermentation	19 h	18 h
- titre à l'arrêt	27 500 unités d'activité/ml (pouvoir caséi- nolytique)	31 000 unités d'activité/ml (pouvoir caséi- nolytique)

- 20 L'activité enzymatique obtenue sur le milieu contenant de la protéine de pomme de terre est donc supérieure d'environ 10 % à celle obtenue sur le milieu à base d'iso-
25 lat de soja.

EXEMPLE 4

Production de bacitracine:

- Le microorganisme utilisé pour la production de bacitracine est le Bacillus Licheniformis déposé à l'ATCC
30 (American Type Culture Collection) sous le N° 10.716.

- Cette souche est conservée au réfrigérateur sous forme d'une suspension de spores en milieu tryptone sel, additionné de 15 % de glycérine, ou sur milieu gélosé trypticase soja. Afin de produire la bacitracine dans un fer-
35 menteur de 20 litres, une préculture du milieu suivant a été inoculée par une suspension de spores, dans un erlenmeyer de 500 ml contenant 60 ml d'un milieu liquide à :

- 1 % peptone
- 1 % extrait de levure

- 1 % malto-dextrine de DE égal à 21-23.

Cet erlenmeyer a été placé sur secoueuse à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Une subculture a ensuite été effectuée dans le même bouillon peptoné qu'indiqué précédemment (erlenmeyer de 5 l contenant 500 ml), dans des conditions identiques, pendant 6 heures.

Deux fermenteurs de 20 litres, comportant des milieux dont la composition est indiquée ci-dessous, ont alors étéensemencés avec 200 ml de cette subculture.

	<u>Fermenteur 1</u>	<u>Fermenteur 2</u>
	- 4 % de farine de soja	- 2,5 % protéine de pomme de terre (identique à celle de l'exemple 1)
15	- 0,5 % CaCO_3	- 0,5 % CaCO_3
	- 0,5 % amidon	- 0,5 % amidon

Les conditions appliquées aux deux fermenteurs ont été rigoureusement identiques, c'est-à-dire :

	- Température : 37°C
20	- Aération : 1 volume/volume/minute
	- Agitation : 500 t/minute.

Le temps de fermentation a été de 24 heures dans les deux cas.

Une unité de bacitracine est définie par la quantité d'antibiotique qui, en dilution de 1 : 1024 dans un bouillon de culture (connu sous l'appellation "beef infusio broth"), inhibe la croissance de *Streptococcus hemolyticus* du groupe A, dans les conditions définies dans le *Biochemical Engineering* (R. Steel, ed.) p. 185 - Mac Millan New York.

Les résultats obtenus dans le cas de deux essais successifs ont été les suivants :

	<u>Fermenteur 1</u>	<u>Fermenteur 2</u>
	Premier essai : 328 unités/ml	385 unités/ml
35	Deuxième essai : 312 unités/ml	374 unités/ml.

De la comparaison de ces chiffres, il apparaît que l'utilisation de protéine de pomme de terre améliore donc, là encore, très nettement les rendements de production.

REVENDICATIONS

1. Procédé de fermentation caractérisé par le fait que l'on a recours, en tant que substance nutritive protéique introduite dans le milieu de fermentation, à une
5 quantité efficace de protéine de pomme de terre obtenue par coagulation des eaux rouges.

2. Substrat de fermentation caractérisé par le fait qu'il contient, en tant que substance nutritive protéique, de la protéine de pomme de terre obtenue par coagu-
10 lation des eaux rouges.

3. Application de la protéine de pomme de terre obtenue par coagulation des eaux rouges, à la constitution d'un substrat de fermentation.